

Prados MB*(1), Lescano M(1), Albanesi Fernández L(2), Ferraro G(1), Porzionato, N(3), Pasquevich D(1) y Curutchet G (3)

(1) Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable, Centro Atómico Bariloche (CAB), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Av. Bustillo 9500, S. C. de Bariloche, Argentina (2) Gerencia de Investigación Aplicada, CAB, CNEA, Av. Bustillo 9500, S. C. de Bariloche, Argentina (3) Instituto de Investigaciones e Ingeniería Ambiental y Escuela de Ciencia y Tecnología, Univ. Nac. De San Martín, Buenos Aires, Argentina.

OBJETIVO

Seleccionar microorganismos electrogénicos (capaces de usar superficies sólidas como aceptores terminales de electrones de su cadena respiratoria) del Río Reconquista para su utilización en sistemas bioelectroquímicos destinados a la remediación de sedimentos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos.

MÉTODOS Y RESULTADOS

1- MUESTREO

- Zona del Arroyo Tributario al Río Reconquista (34°31'19,8'' S 58°35'28,2'' W). Octubre 2015. Las muestras se colectaron de forma compuesta en un área de 1 m², se almacenaron con su humedad original en envases de polietileno a 4°C a fin de mantener inalteradas sus condiciones y luego se burbujó con N₂ para mantener condiciones de anaerobiosis.
- Análisis de la especiación de metales pesados por la técnica de extracción química selectiva secuencial. Las concentraciones se determinaron por Espectrometría de Absorción Atómica con llama de aire-acetileno (EAA, Sensa AA de GBC Scientific Equipment).

Cu (II) [mg Kg ⁻¹]	15
Cr (total) [mg Kg ⁻¹]	7
Zn (II) [mg Kg ⁻¹]	330

2- ENRIQUECIMIENTO Fe Reductoras

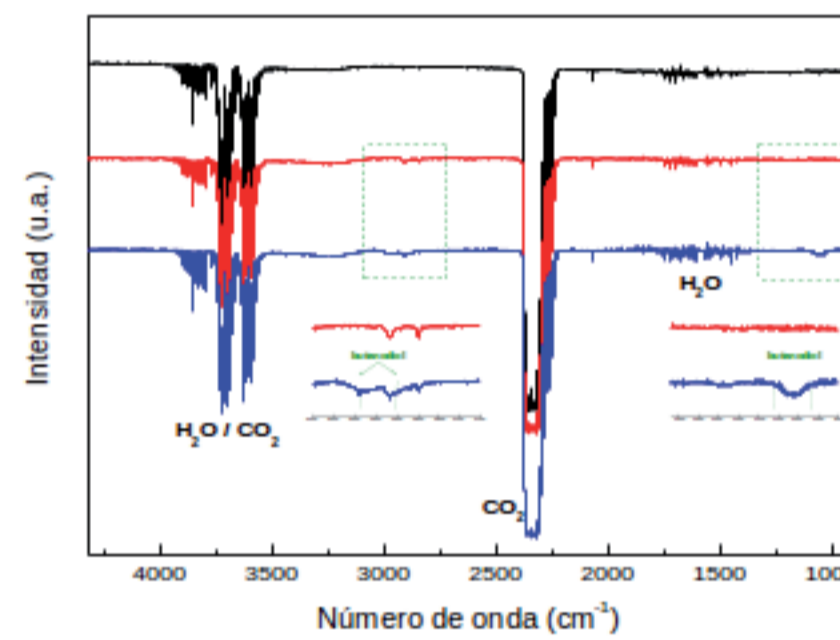
- Se colocaron 16 mg de muestra en 50 ml de Medio 579 DSMZ (Geobacter Medium), anaeróbico por burbujeo con N₂:CO₂ 80:20.
- Se colocaron 16 mg de muestra en iguales condiciones que el anterior. Duración: 12 días.

3- SELECCION DE MICROORGANISMOS ELECTROGENICOS

Se armaron 3 celdas electrolíticas con 200 ml de Medio 579 DSMZ, con acetato de sodio como dador de electrones y sin aceptor de electrones, en agitación y burbujeo constante (N₂:CO₂), y a una temperatura controlada de 30,5°C. El experimento duró 41 días.
 Electrodo de Trabajo: Barra de Grafito, área superficial por BET: 0,204 +/- 0,01 m²/g, peso promedio: 2,2675 gr.
 Contra Electrodo: alambre de platino de 0,5 mm de diámetro.
 Electrodo de Referencia: Ag/AgCl MF-2052 RE-5b.
 Potenciostato/Galvanostato Tipo Autolab PGSTAT101

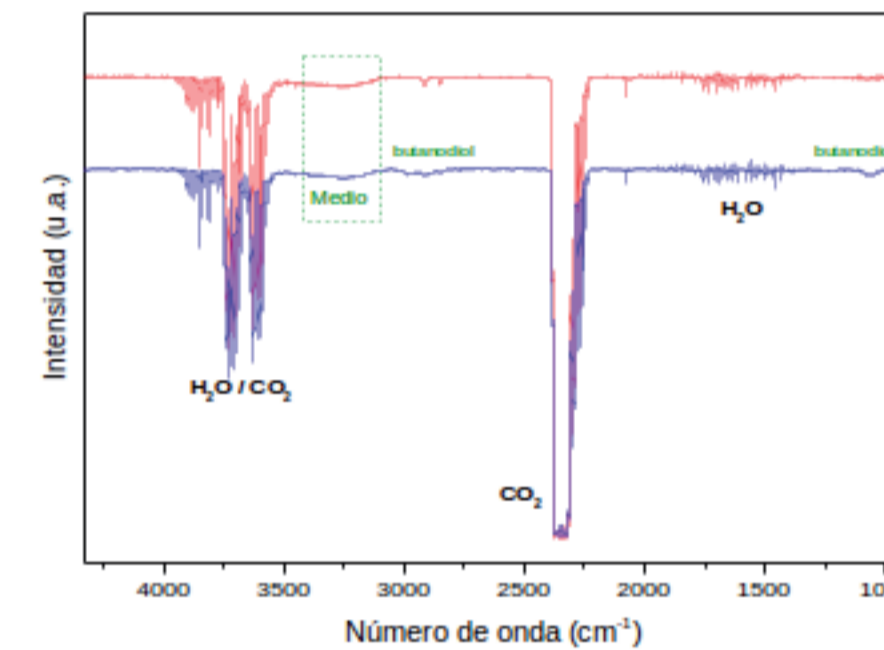
CELDA #1

Electrodo de trabajo polarizado a 240 mV, inoculada con 7 ml del enriquecimiento de Fe reductoras (1).



CONTROL #1

Electrodo de trabajo no polarizado, inoculada con 7 ml del enriquecimiento de Fe reductoras (1).



CONTROL #2

Electrodo de trabajo polarizado a 240 mV, inoculada con 7 ml del control del enriquecimiento previo (2).

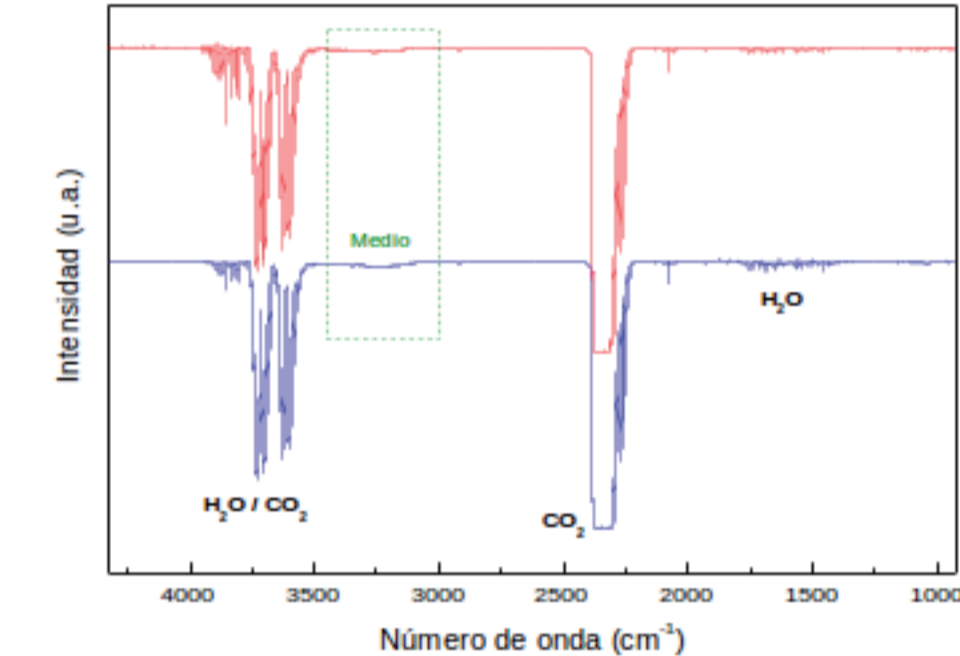


Figura 1: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). Se colectaron muestras de gas cada 24 hs de las 3 celdas. Por claridad, solamente se muestra a t0 (azul) y a tn (rojo). A t0 de la celda #1 y control #1 se detectó 2,3-butanodiol, producto de la fermentación de citrato.

4-CARACTERIZACIÓN

- Crecimiento en Medio (DSMZ Medium 826) con fumarato de Sodio como aceptor de electrones.
- Crecimiento en medio con citrato de Fe como aceptor de electrones.
- Producción de gases evaluada por FTIR.
- Caracterización por tinción de Gram y formación de esporas (Fig. 6).

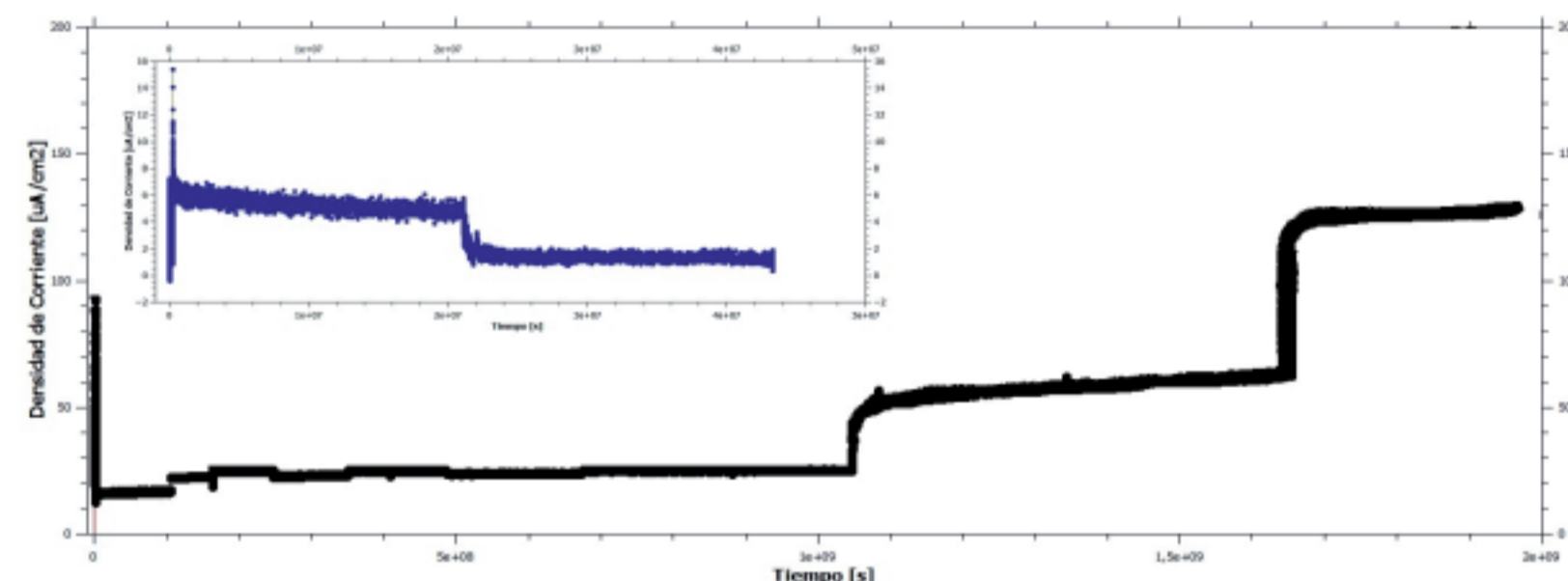


Figura 2: Cronoamperometría de la Celda #1 a 240 mV, desde 0 a 21 días y a 480 mV, desde el día 21 al 41. Durante los primeros 14 días permaneció la intensidad de corriente estable y cercana a cero. A los 15 y 30 días se renovó el medio completamente. El día 21 se mantuvo el electrodo despolarizado durante 12 hs y luego se cambió el potencial a 480 mV. A partir del día 35 se duplica la intensidad de corriente y se observa un color rojizo en la superficie del electrodo de trabajo, siendo el valor máximo de corriente alcanzado de 140 µA/cm². En el recuadro se muestra la cronoamperometría correspondiente al control #2.

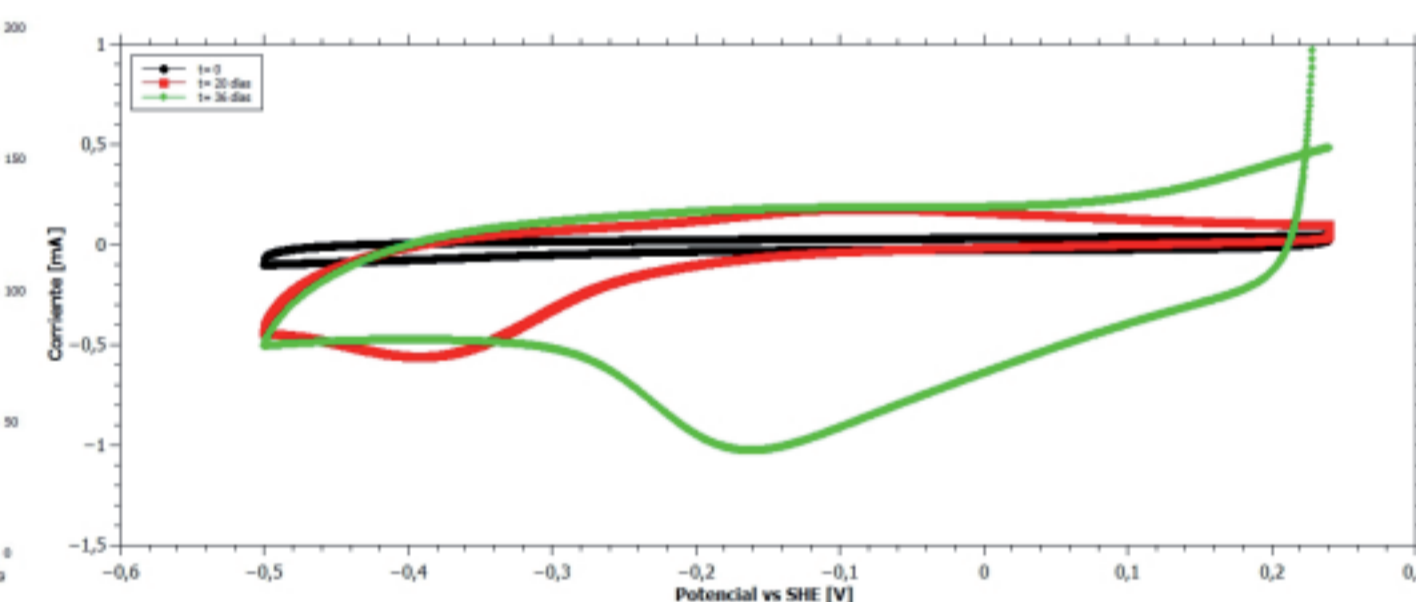


Figura 3: Voltametría Cíclica de la Celda #1 a distintos tiempos, v=10 mV/s. Se observa a los 20 días un proceso con características similares a las observadas en el desarrollo de Biofilms de *Geobacter Sulfurreducens*. A los 36 días se observa un proceso irreversible o quasirreversible similar a los procesos de deposición sobre la superficie del electrodo.

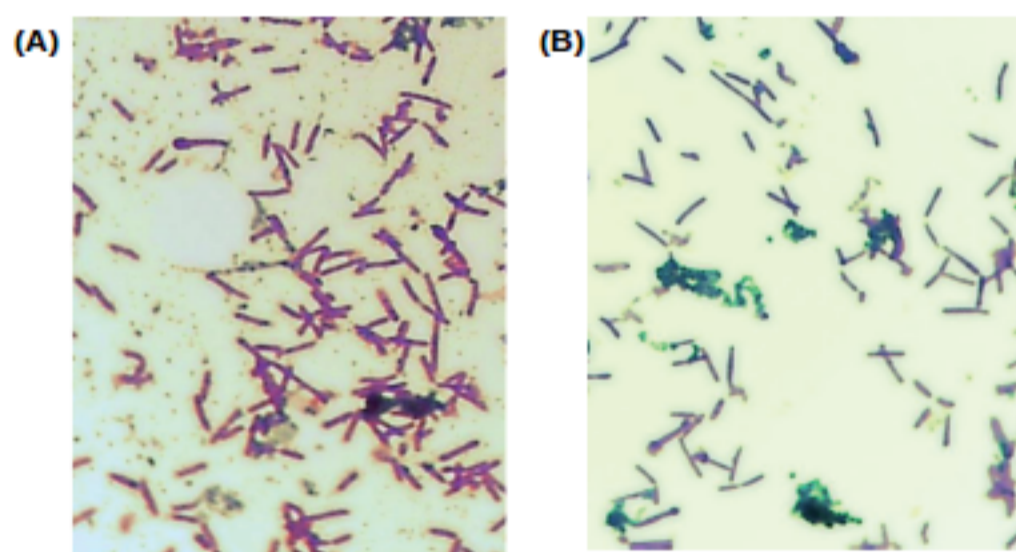


Figura 6: Caracterización por (A) tinción de Gram y (B) formación de esporas. Los microorganismos seleccionados fueron capaces de crecer en presencia de los diferentes aceptores de electrones probados. A partir de los dos días de crecimiento con fumarato se empieza a observar la formación de esporas. En medio con citrato de hierro es más difícil determinar la esporulación ya que a medida que aumenta la reducción de Fe las bacterias empiezan a aglutinarse y decantan en el fondo del vial. Solamente se detectó CO₂ durante el crecimiento en ambos medios de cultivo.

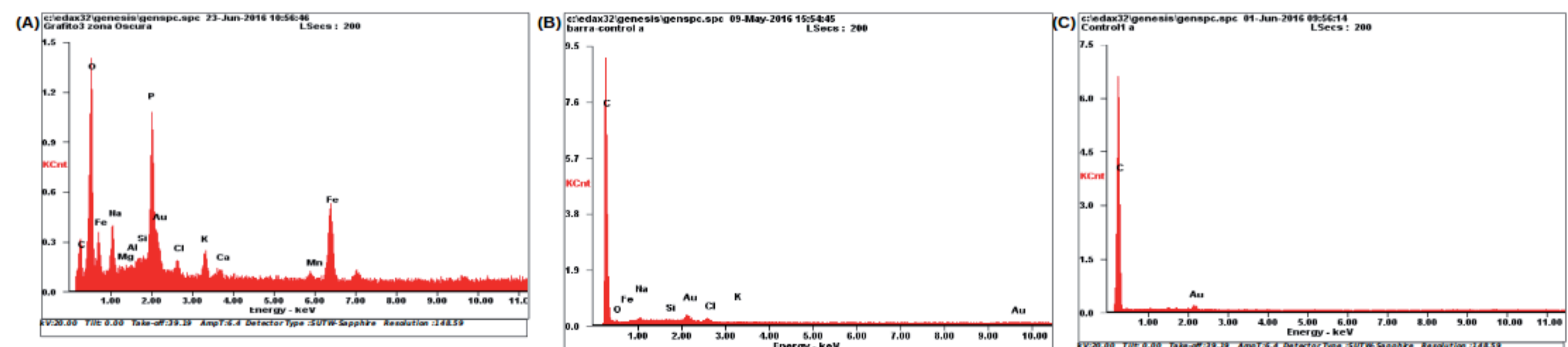


Figura 4: Espectroscopia de energía dispersiva (EDS) de la superficie de los electrodos de trabajo de cada celda. (A) Se evidencia la presencia de Fe en la superficie del electrodo de la celda #1. En los electrodos de ambos controles (B) y (C) no hubo inmovilización de metales.

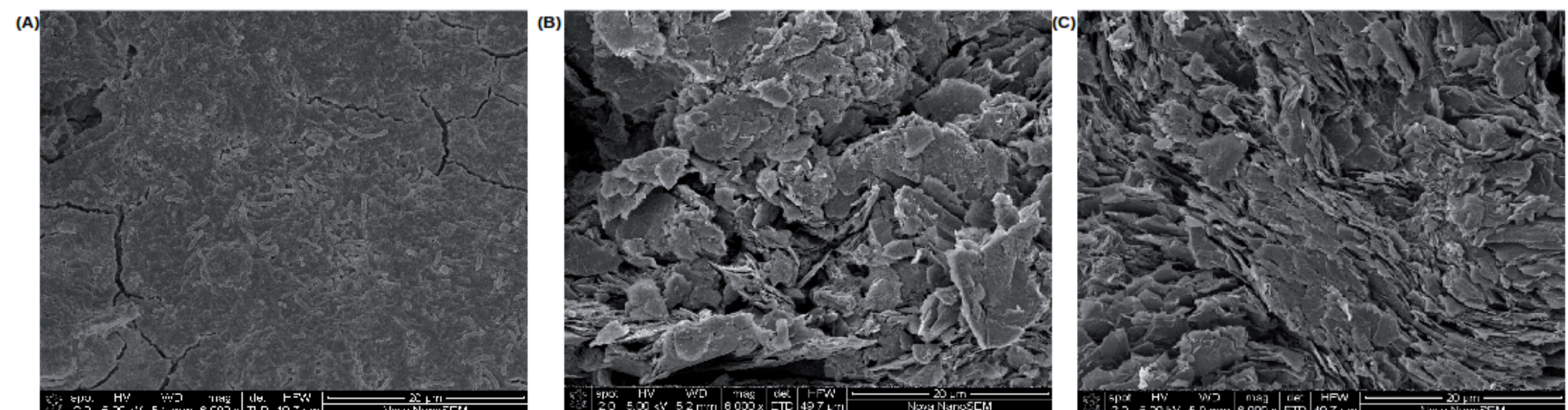


Figura 5: Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) de los electrodos de trabajo de cada una de las celdas. (A) Biofilm de microorganismos bacilares sobre el grafito de la celda #1. (B) En el electrodo no polarizado no se observó crecimiento de microorganismos, como tampoco en el (C) electrodo del control inoculado con muestra estéril. En este último caso, puede verse el efecto de cizalla, que produce la polarización sobre las láminas de grafito, en contraste con lo observado en (B), con la barra no polarizada.

CONCLUSIONES

El protocolo empleado en este trabajo permitió la selección de microorganismos electrogénicos capaces de formar biofilm en un electrodo polarizado. Los mismos son bacilos, Gram (-), forman esporas en posición lateral y terminal, no fermentan Citrato. Finalmente, el biofilm desarrollado demostró ser capaz de inmovilizar Fe al grafito.

AGRADECIMIENTOS

Dpto. Caracterización de Materiales – Servicio de Microscopia y Rayos X- Tec. PAULA TROYON- Tec. MANUEL CORTE - Gerencia Investigación Aplicada- Tec. SILVIA RIVAS- Centro Atómico Bariloche.